

Use of algin oligosaccharide in anti-senility and anti-dementia

Publication number: CN1408360

Also published as:

Publication date: 2003-04-09

 CN1160080C (C)

Inventor: GUAN HUASHI (CN); LI GUILING (CN)

Applicant: QINGDAO OCEAN UNIV (CN)

Classification:

- **international:** A61K31/702; A61P25/28; A61P43/00; A61K31/702;
A61P25/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K31/702;
A61P25/28; A61P43/00

- **europen:**

Application number: CN20011027533 20011001

Priority number(s): CN20011027533 20011001

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1408360

The present invention features the application of algin oligosaccharide in medicine for treating anti-senility and anti-dementia. Mouse with algin oligosaccharide taken has raised spatial learning memory level, 2.3 times raised choline acetylase activity of pallium, 15% raised cerebral antioxidant enzyme SOD activity, 49 % lowered monoamine oxidase B activity and 1.17 times lowered NMDA acceptor activity. Results show that algin oligosaccharide can raise cerebral antioxidant enzyme activity, lower monoamine oxidase B activity, promote the synthesis of acetyl choline, reduce the oxidation activity of nerve transmitter, eliminate the damage of free radical to neure and thus has the anti-senility and anti-dementia functions.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/702

A61P 25/28 A61P 43/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01127533.2

[43] 公开日 2003 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 1408360A

[22] 申请日 2001.10.1 [21] 申请号 01127533.2

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

[71] 申请人 青岛海洋大学

代理人 崔清晨

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 管华诗 李桂玲 于广利 蒋 新

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 褐藻胶寡糖在抗衰老和抗痴呆中的应用

[57] 摘要

一种褐藻胶寡糖，其特征是把它用作抗衰老和抗痴呆的药物。小鼠服药后空间学习记忆水平提高，大脑皮层胆碱乙酰化酶活性提高 2.3 倍，脑内抗氧化酶 SOD 活性提高 15%，单胺氧化酶 B 的活性降低到 49%，NMDA 受体活性降低 1.17 倍，结果表明褐藻胶寡糖可提高脑内抗氧化酶的活性，降低单胺氧化酶 B 的活性，促进乙酰胆碱合成，从而减少神经递质的氧化灭活，消除自由基对神经元的损伤，具有抗衰老和抗痴呆作用。

ISSN 1008-4274

1、 一种褐藻胶寡糖，其特征是把它用作抗衰老和抗痴呆的药物。

褐藻胶寡糖在抗衰老和抗痴呆中的应用

本发明涉及一种褐藻胶寡糖，特别是涉及一种褐藻胶寡糖在抗衰老和抗痴呆中的应用。

本申请人在申请号为 01107952.5 的中国专利中披露了一种褐藻胶寡糖的制造方法，用该方法制造出来的褐藻胶寡糖包括甘露糖醛酸寡糖 (MO) 和古罗糖醛酸寡糖 (GO)，这些寡糖均能大规模生产，价格低。经进一步研究得知，褐藻胶寡糖具有抗衰老和预防因东莨菪碱所致痴呆的作用，而目前在治疗这些疾病方面尚未见到有效的药物。

本发明的目的是提供一种褐藻胶寡糖在抗衰老和抗痴呆中的应用，它能弥补现有技术上的上述不足。

一种褐藻胶寡糖，其特征是把它用作抗衰老和抗痴呆的药物。

本发明的药物能大规模生产，价格低廉，能有效地抗衰老和抗痴呆。

下面通过实施例说明本发明。

采用东莨菪碱皮下注射的方法建立抗痴呆的小鼠模型。东莨菪碱水溶液的浓度为 5mg/kg，将 MO 和 GO 按 1: 1 和 1: 5 的重量比分别配制成 H1 和 H2 的混合物，并将它们分别配制成水溶液，浓度均为 120mg/kg, 0.4ml/ 只/天灌胃给药。经检查，连续服用上述寡糖 7 天后，和模型组比较，小鼠的空间学习记忆水平 (Morris 水迷宫实验) 提高，大脑皮层胆碱乙酰化酶 (ChAT) 活性提高了 2.3 倍，脑内抗氧化酶 SOD 活性提高了 15%，单胺氧化酶 MAO-B 的活性降低到 49%，NMDA 受体活性降低 1.17 倍，这些结果表明褐藻胶寡糖可提高脑内抗氧化酶的活性，降低单胺氧化酶 B 的活性，促进乙酰胆碱合成，从而减少神经递质的氧化灭活，消除自由基对神经元的损伤，具有抗衰老和抗痴呆作用。

本实施例中的褐藻胶寡糖包括甘露糖醛酸寡糖和古落糖醛酸寡糖以及它们的混合物。本发明的药物为海洋多糖类药物，亦简称海洋药物。

下面对实验材料和方法以及实验结果做详细说明。

材料和方法

1. 实验动物及分组

选用健康昆明种雄性小鼠，体重 20 ± 1.6 克，由中国军事医学科学院实验动物中心提供。按随机方法将小鼠分为六组，每组 8 只。第一组为对照组；第二组为单独 H1 给药组；第三组为单独 H2 给药组；第四组为东莨菪碱给药模型组；第五组为模型加 H1 给药组；第六组为模型加 H2 给药组。

2. 给药剂量及方法

两种药物由青岛海洋大学华海制药厂提供。药物为乳白色粉末，各取 1.12g 溶于 100ml 生理盐水中。用时稀释为 11.2mg/ml，按 140mg/kg, 0.3ml/只/d 灌胃给药，连续 7 天；对照组和模型组灌服等量蒸馏水。于开始灌胃后的第八天，第四、五、六组一次性皮下注射东莨菪碱 5mg/kg。

3. Morris 水迷宫实验

动物于造模前 1 天及造模后 30 min 和 24h 共 3 次进行 Morris 水迷宫学习和检测试验。水迷宫主要由一圆柱型水池和一可移动位置的站台组成。水池高 70cm, 直径 80cm, 站台直径 8cm, 水池上空通过一个数字摄相机与计算机相连接。预先在水池中注入清水, 水深 15cm, 加入炭素墨水使池水变为不透明的黑色, 站台表面为黑色, 使小鼠不能看到, 水面高出站台表面 0.5cm。水温控制在 22±0.5℃, 在水池上标定相同一点作为每次实验小鼠的入水点。站台置于离入水点较远的象限中间, 实验过程保持站台位置不变。每次实验以 120s 为限, 纪录动物从入水点到达站台所需时间 (潜伏期作为学习记忆成绩, 若设定时间内未找到站台, 计算机停止跟踪, 记录时间为 120s)。

4. 酶活性检测

(1) 过氧化物歧化酶 (SOD) 测定: 于行为测试后将小鼠断头取脑, 在冰浴中迅速匀浆, 4000g 离心 20 分钟, 取 3μl 进行 SOD 活性测定。样品中氧自由基氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂作用下呈现紫色。当 SOD 活力较高时, 超氧阴离子自由基被专一性的抑制, 使形成的亚硝酸盐减少, 用可见分光光度计测其吸光度, 在 550 nm 处比色测定 SOD 活力。

(2) 胆碱乙酰化转移酶 (ChAT) 活性测定

采用同位素标记合成法。取脑匀浆上清 20 μl 加入 50 μl 反应液 (含氯化胆碱 1.0 mmol/L, 硫酸毒扁豆碱 1 mmol/L, 乙二胺四乙酸 1.0 mmol/L, 溶于 300 mmol/L PBS, pH 7.4) 和 10 μl ³H-乙酰辅酶 A (³H-CoA, 终浓度 0.1 mmol/L), 于 37℃ 反应 30min 后, 用 3 ml 冷的 PBS (含氯化乙酰胆碱 35.7 mg/L) 终止反应。并加入含有 10mg 四苯硼钠的乙腈 2 ml, 再加入 6ml 甲苯闪烁液, 轻轻振摇 1 min, 使生成的 ³H-Ach 移向有机溶媒层, 10min 后在液体闪烁记数仪上测定 CPM 值。结果以每分钟每毫克蛋白生成的 ³H-Ach 的克分子数表示。

(3) 单胺氧化酶 B (MAO-B) 活性测定

取 10ul 脑匀浆上清加 40ul PBS, 10ul 含同位素的底物混匀后在 37℃ 水浴中孵育 20min, 用 0.1ml 2 mol/L 的 HCl 终止反应, 用甲苯 6ml 萃取反应物离心吸取上清液 4ml 移入闪烁瓶, 每杯加 5ml 甲苯闪烁液, 在液体闪烁记数仪上测定 cpm 值。

5. 受体结合实验

(1) 脑突触粗膜制备: 大鼠断头取脑后以 1:20 倍容积加入 Tris-醋酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.4), 在冰浴中用玻璃匀浆器研磨 1 min, 匀浆于 4℃ 15000g 离心 30min, 重复 4 遍, 弃上清, 将沉淀冻于 -70℃ 备用, 此即为脑突触粗膜。

(2) M 受体测定: 取 100 μl 突触粗膜加入 M 受体的配基 ³H-QNB (二苯羟乙酸奎宁酯) 10 μl (终浓度 0.1 nmol/L), 非特异结合管中加入 0.1 mmol/L 阿托品, 于 25℃ 水浴振荡孵育 60min 后, 加入预冷的 0.05 M PBS 5 ml, 抽滤在玻璃纤维素膜上, 再用 15 ml PBS 淋洗。玻璃纤维素膜移入液闪杯中, 加入含 Triton 的甲苯闪烁液 7 ml, 于液闪计数仪上测放射活性。

(3) NMDA 受体测定: 取 100 μl 突触粗膜, 加入 NMDA 受体的配基 ³H-MK801 10 μl (终浓度 0.5 nmol/L)。非特异结合管中加入非标记的 MK801, 于 30℃ 水浴振荡孵育 30 min 后, 加入预冷的 Tris-醋酸缓冲液 5 ml, 抽滤在纤维素膜上, 再用 20 ml 缓冲液淋洗。滤膜移入液闪杯中, 加入含 Triton 的甲苯闪烁液 7 ml, 于液闪计数仪上测放射活性。

6. 蛋白测定

采用 Bradford 法。用考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质相互作用后的光吸收值测定样品中的蛋白浓度, 用牛血清白蛋白作为标准蛋白。

7. 统计学处理

数据输入计算机, 用 Microsoft 公司的 Excel 2000 进行统计学处理, 实验结果均以“均值±标准误” (Means±SE) 表示, 组间比较用 Student's t 检验。

实验结果

1. 水迷宫试验结果:

以 Morris 水迷宫法检测小鼠空间学习记忆能力。从第一次学习测试可以看到各组间寻找站台的潜伏期无明显差异。但造模 30min 后, 未注射东莨菪碱的三组小鼠中, 服用 H1、H2 的小鼠其潜伏期(缩短到对照组的 73% 和 72%, 说明给正常小鼠单独服用海洋药 H1、H2 有增强学习记忆的作用, 24h 后的也看到同样效果。但药物对模型鼠的作用在 24h 后比较明显, 此时模型鼠的潜伏期最长, H1、H2 给药组分别是其 81% 和 76%, 有改善作用(表 1)。

表 1. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠 Morris 水迷宫实验的影响

组别	剂 量 (mg/kg)	n	寻找平台潜伏期(秒)		
			第 1 次	第 2 次	第 3 次
对照组	等量生理盐水	8	87.1±15.4	78.5±15.8	46.3±12.3
海洋多糖 H 1	140	8	81.9±15.5	57.3±15.2	35.0±10.3
海洋多糖 H 2	140	8	103.9±13.2	56.4±13.6	37.9±10.9
东莨菪碱 (Sco)	5	8	87.9±14.0	84.3±14.0	55.5±15.0
Sco + H 1	5+140	8	102.5±10.7	75.8±13.1	45.0±11.9
Sco + H 2	5+140	8	57.4±16.1	92.0±12.8	42.4±11.5

2. 过氧化物歧化酶 (SOD) 活性

对照组与模型组未见明显差异, 可能与模型类型有关。但所有给予海洋药物的小鼠 SOD 活性均明显高于未给药组。H1、H2 单独给药与对照组比有显著差异, $p<0.001$; H2 对模型组 SOD 有明显增强作用, $p<0.05$, H1 的作用更显著, $p<0.001$ 。见表 2。

表 2. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠脑 SOD 活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	SOD 活性 (UN/mg prot.)
对照组	等量生理盐水	8	61.20 ± 1.05
海洋多糖 H 1	140	8	68.86 ± 1.58 *
海洋多糖 H 2	140	8	68.65 ± 0.86 *
东莨菪碱 (Sco)	5	8	62.93 ± 2.71
Sco + H 1	5+140	8	69.71 ± 1.71 #
Sco + H 2	5+140	8	72.30 ± 1.95 ##

* $p<0.001$, 与对照组比较; # $p<0.05$; ## $p<0.001$, 与模型组比较

3. 胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活性

模型组 ChAT 活性低于对照组, 但无明显统计学意义。在给药组, 只有模型 H2 给药组其 ChAT 活性提高了 2.23 倍, 有极显著性差异。其它给药组变化不明显, 见表 3。

表 3. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠脑 ChAT 活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	ChAT 活性 (pmol/mg prot./min)
对照组	等量生理盐水	8	22.72±2.29
海洋多糖 H 1	140	8	18.55±0.75
海洋多糖 H 2	140	8	16.88±2.04
东莨菪碱 (Sco)	5	8	18.96±1.79
Sco + H1	5+140	8	18.05±1.00
Sco + H2	5+140	8	42.31±5.67 #

p< 0.001, 与模型组比较

4. 单胺氧化酶 B (MAO-B) 活性

MAO-B 是代谢脑内单胺类介质的氧化酶, 其活性随年龄增长而增高, 是脑老化的重要指标之一。本实验观察到模型组小鼠脑内 MAO-B 高于其它任何组, 但经过 H1 和 H2 给药的两组小鼠 MAO-B 活性明显下降, 均有明显统计学差异, H1 的抑制效果更强 (见表 4)。

表 4. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠脑 MAO-B 活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	MAO-B 活性 (pmol/mg prot./min)
对照组	等量生理盐水	8	358.7±33.6
海洋多糖 H 1	140	8	331.2±25.7
海洋多糖 H 2	140	8	358.8±33.4
东莨菪碱 (Sco)	5	8	402.4±26.6
Sco + H1	5+140	8	306.8±20.5 #
Sco + H2	5+140	8	281.2±19.9 ##

p< 0.05; ## p< 0.001, 与模型组比较

5. 胆碱能毒蕈碱 M 受体结合活性

模型组在经东莨菪碱 5mg 皮下注射后, M 受体结合活性代偿性增高了, 对照组和 H1 、 H2 给药组之间无明显差异, 说明两药物可以维持该受体在一个正常范围内。见表 5。

表 5. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠脑内胆碱能 M 受体结合活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	³ H-QNB binding (pmol/mg prot.)
对照组	等量生理盐水	8	7.59±0.34
海洋多糖 H 1	140	8	7.07±0.42
海洋多糖 H 2	140	8	7.91±0.23
东莨菪碱 (Sco)	5	8	8.04±0.20
Sco + H1	5+140	8	7.75±0.17
Sco + H2	5+140	8	7.83±0.22

6. 谷氨酸 NMDA 受体结合活性

谷氨酸是脑内含量最高的兴奋性神经传导介质。其受体的重要亚型 NMDA 受体与突触可塑性及学习记忆功能密切相关。本实验模型鼠的该受体结合活性最低, 但服用 H1 、 H2 后可见显著提高, 并具有明显统计学意义 (p<0.05), 见表 5。

表 6. 海洋多糖类药 H1 、 H2 对小鼠脑内胆碱能 NMDA 受体结合活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	n	$^3\text{H}-\text{MK801}$ binding (fmol/mg prot.)
对照组	等量生理盐水	8	289.45±19.25
海洋多糖 H 1	140	8	287.70±20.30
海洋多糖 H 2	140	8	307.65±10.50
东莨菪碱 (Sco)	5	8	252.35±16.45
Sco + H1	5+140	8	292.60±21.35
Sco + H2	5+140	8	294.35±11.55 #

p< 0.05, 与模型组比